

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





REC'D	20 MAY 1997
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY DOCUMENT**  
**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **15 AVR. 1997**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Telephone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

1951



1

2

3

1951

## REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN  
TITRE DE PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE \*

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la  
demande initiale

## 2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT  
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÈRE  
DU RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☒ NONSI L'OPTION CHOISIE EST NON ET  
SI LE DEMANDEUR EST UNE  
PERSONNE PHYSIQUE IL  
REQUIERT LE PAIEMENT  
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE  
DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☒ NON

NATURE

NUMERO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

12 AVR. 1996

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 04623 -

DATE DE DÉPÔT

12 AVR. 1996

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

## 3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AÎNÉ

3, Avenue bugaud

75116 PARIS

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

## 7 TITRE DE L'INVENTION

Moyens pour la détection de bactéries du genre Taylorella et applications biologiques

## 8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

Conseil Général de l'Orne

## 9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

Hôtel du Département  
39, rue Saint-Blaise  
B.P. 528

61017 ALENCON CEDEX

PAYS

FRANCE

## 10 NATIONALITÉ(S)

Française

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSEES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ☒ DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

## 11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE  
INVENTEUR☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE  
PHYSIQUE NON IMPOSABLE IL  
REQUIERT QU'IL AÏEUS LA REDUCTION  
DES REDEVANCES☐ OUI☒ NON

## 13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

☐ DIVISIONSANTÉRIEURES À LA  
PRÉSENTE DEMANDE

11

12

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE - N° D'INSCRIPTION

Mandataire : Chantal PEAUCELLE

N° 92-1189

SIGNATURE DU DÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

G49

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9604623

**TITRE DE L'INVENTION :** Moyens pour la détection de bactéries du genre Taylorella  
et applications biologiques

**LE (S) SOUSSIGNÉ (S)** Madame PEAUCELLE Chantal

**DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

Docteur KLEIN Frédéric

7-9 Avenue du Basingstoke

61000 ALENCON

Docteur GRADINARU Dragos

21, rue l'Abbé Letacq

61000 ALENCON

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 12 Avril 1996

N° 92-1189



## DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
36				13/04/96	17 JUL. 1996 - O L
43, 44			X	02/09/96	04 SEP. 1996 - O L

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

BT 244 / 171180

Moyens pour la détection de bactéries du genre *Taylorella* et applications biologiques.

- 5 L'invention a pour objet des moyens pour la détection de bactéries du genre *Taylorella* et leurs applications biologiques.

Elle vise en particulier la détection de *T. equigenitalis*  
10 et le traitement ou la prévention d'infections provoquées par des bactéries de cette espèce.

La première souche de *T. equigenitalis* a été isolée par Crowhurst, 1977, Vet. Rec. 100, 476 et caractérisée  
15 par Taylor et al., 1978, Equine Vet. J. 10, 136-134. Cette bactérie est l'agent d'une maladie vénérienne des équidés dénommée métrite contagieuse équine (désignée ci-après par MCE).

20 Depuis le déclenchement de cette maladie en 1977 à Newmarket (Grande-Bretagne), la MCE s'est répandue parmi la population équine dans le monde (Europe, USA, Japon).

La MCE a été initialement caractérisée par  
25 l'apparition d'écoulements vaginaux purulents causés par une endométrite aiguë. L'épidémiologie et les



manifestations cliniques de la maladie ont maintenant  
changé. Il ne subsiste que quelques rares foyers  
présentant une forme aiguë de la MCE ; il s'agit alors de  
contaminations de plusieurs juments faisant partie d'un  
5 même harem. Les formes cliniques de métrite sont, en  
effet, devenues rares et *T. equigenitalis* est  
principalement trouvée chez des porteurs asymptomatiques  
ou au stade pré-clinique. La maladie est transmise par  
les étalons qui ne manifestent aucun symptôme clinique.

10

Un dépistage systématique des étalons et des juments  
est devenu obligatoire préalablement à chaque saison de  
monte.

15

Pour des raisons à la fois économiques et  
d'organisation, ce dépistage systématique ne peut se  
faire qu'à partir d'un ou de deux prélèvement(s) par  
animal et par saison. La fiabilité du dépistage en est  
donc d'autant plus cruciale.

20

Le test de dépistage d'une infection par *T.*  
*equigenitalis* actuellement pratiqué en France repose  
principalement sur l'isolement de la bactérie par culture  
sur milieux nutritifs et/ou sélectifs et sur  
25 l'identification de cet agent selon des critères  
morphologiques et biochimiques. Or, *T. equigenitalis* est

une bactérie très fragile et à très lente croissance (le délai d'observation des boîtes d'ensemencement est d'au moins 6 jours). Elle est, de plus, susceptible d'être inhibée par d'autres bactéries de la flore examinée. Les critères d'identification des différentes souches de *T. equigenitalis* sont eux-mêmes soit trop succincts et sujets à variations (mise en évidence d'absence d'activité pour les trois activités enzymatiques classiques que *T. equigenitalis* présente), soit trop lourds à gérer dans les délais requis. Le dépistage par la seule technique de bactériologie est donc devenu une méthode hasardeuse de diagnostic. Un pourcentage non déterminé de porteurs sains est ainsi chaque saison considéré comme non infecté.

15

Un second test de dépistage d'une infection par *T. equigenitalis* a été retenu en France. Ce test est basé sur l'identification de la bactérie par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antisérum fabriqué sur lapin et d'anticorps fluorescents anti-lapin. Ce test de dépistage présente l'avantage de livrer ses résultats beaucoup plus rapidement (24 à 48 heures) qu'un test par culture bactériologique.

L'utilisation de cette technique peut toutefois conduire à des erreurs par excès (faux positifs), les antisera utilisés donnant lieu, dans de nombreux cas, à

25

des réactions avec des espèces autres que *T. equigenitalis*

La portée de ces résultats est ainsi très  
5 restreinte: si le test d'immunofluorescence est négatif,  
le laboratoire agréé peut communiquer une conclusion  
négative, mais, si le résultat est positif, ce résultat  
doit être confirmé ou infirmé par la bactériologie.

10 Les inventeurs ont recherché à remédier à ces  
difficultés de dépistage d'une infection par *T. equigenitalis*, en élaborant de nouveaux moyens permettant  
d'identifier une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*  
sans risque ni de faux positifs, ni de faux négatifs. La  
15 présente invention présente également les avantages de la  
rapidité et de la facilité d'exécution.

L'invention vise donc à fournir des moyens pour une  
détection spécifique, de grande fiabilité, de *T. equigenitalis*,  
20 basés sur les reconnaissances de type  
antigène-anticorps défini.

Elle vise également l'utilisation de ces moyens pour  
le diagnostic, le traitement et la prophylaxie des  
maladies causées par *T. equigenitalis*.

25 Selon un premier aspect, les moyens de l'invention  
sont des anticorps monoclonaux caractérisés en ce qu'ils

reconnaissent un épitope d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*.

De manière avantageuse, ces anticorps ne présentent pas de réactions croisées avec un ou des épitopes d'une bactérie *Taylorella* d'une espèce différente ou d'une bactérie d'un genre différent. Ils permettent donc de détecter *T. equigenitalis* avec sûreté et, selon un aspect de grand intérêt, à l'aide d'un seul test .

Les anticorps monoclonaux de l'invention (désignés ci-après par AcM en abrégé) sont également tels qu'obtenus à partir d'hybrides, par fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* inactivée ou d'extrait(s) d'une telle souche, clonage et sélection selon la propriété de leur surnageant de culture à reconnaître un ou des épitope(s) d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*, et récupération des anticorps recherchés, suivie le cas échéant de leur purification.

20

L'invention vise également les fragments des AcM définis ci-dessus, plus particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>.

25

Les AcM de l'invention et, le cas échéant, leurs fragments, sont encore caractérisés en ce qu'ils sont

capables de reconnaître des protéines de *T. equigenitalis* du groupe comprenant des protéines telles que les protéines de 150, 120, 52,7 ou 22 (LPS) kDa.

5        Selon un deuxième aspect, les moyens de l'invention sont des protéines immunogènes caractérisées en ce qu'elles sont capables d'interagir avec lesdits AcM ou leurs fragments.

10       Ces protéines sont obtenues, grâce aux dits AcM ou à leurs fragments, à partir de *T. equigenitalis*, ou par voie de synthèse.

15       Selon un troisième aspect, les moyens de l'invention sont des anti-anticorps (désignés ci-après par anti-AcM en abrégé) et les fragments de ces anti-anticorps, ces anti-AcM et leurs fragments étant caractérisés en ce qu'ils sont capables d'interagir avec les AcM ou leurs fragments définis plus haut.

20

L'invention vise également des procédés d'obtention des moyens définis ci-dessus.

25       Pour produire les AcM de l'invention, ou les anti-AcM, on a avantageusement recours à la technique

d'obtention d'hybridomes telle que décrite par Kohler et Milstein dans Nature 1975, 256, 495-497.

L'invention vise donc un procédé d'obtention et  
5 de sélection des AcM définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris  
10 immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* ou d'extrait(s) d'une telle souche,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que, notamment, l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture  
15 présentent une réaction positive avec une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis* ou un fragment de celle-ci,

- le clonage de tels hybridomes, au regard de leur réactivité par rapport à *T. equigenitalis*, et

- la récupération des AcM recherchés, suivie le cas  
20 échéant de leur purification.

L'invention vise également l'application de la technique ci-dessus pour la production d'anticorps anti-AcM.

On utilise dans ce cas des cellules spléniques de  
25 souris immunisées au préalable à l'aide des AcM déjà définis. Les souches clonées peuvent être conservées dans

de l'azote liquide et leurs surnageants de culture à -  
20°C. Ces souches qui sont caractérisées par le fait  
qu'elles sont capables de produire des AcM ou  
respectivement des anti-AcM, tels que définis ci-dessus,  
5 entrent également dans le cadre de l'invention. De  
manière générale, l'invention vise les souches  
d'hybridomes telles qu'obtenues selon les procédés  
définis plus haut.

Les fragments des AcM et les anti-AcM peuvent être  
10 aisément obtenus à l'aide des techniques enzymatiques  
conventionnelles.

Avec les trois aspects définis ci-dessus, à savoir  
les AcM ou leurs fragments, les protéines immunogènes, et  
les anti-AcM ou leurs fragments, l'invention fournit les  
15 moyens pour établir, soit directement, soit  
indirectement, une contamination éventuelle d'un  
échantillon ou d'une culture avec une bactérie de  
l'espèce de *T. equigenitalis*.

20 Dans le cadre d'une telle détermination, l'invention  
vise une méthode d'identification d'une bactérie de  
l'espèce *T. equigenitalis* ou d'un ou plusieurs épitopes  
d'une telle bactérie dans un échantillon ou dans une  
culture, caractérisée en ce qu'elle comprend :

25 - la mise en contact de l'échantillon ou de la  
culture à analyser, susceptible de renfermer *T.*

*equigenitalis*, avec une quantité efficace d'au moins un AcM ou un fragment d'AcM, ou en variante, pour mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre *T. equigenitalis*, une quantité efficace d'une protéine immunogène ou d'anticorps anti-AcM, ou de fragments de ce  
5 dernier, tels que définis ci-dessus,

- la révélation du produit de réaction de type antigène-anticorps éventuellement formé.

L'étape de mise en contact est réalisée dans  
10 des conditions notamment de durée, température, tampon, permettant l'établissement d'une réaction de type antigène-anticorps. Pour la révélation, on utilise des marqueurs, par exemple des marqueurs fluorescents, enzymatiques, radioactifs ou luminescents.

15 On remarquera que le choix judicieux d'un AcM particulier, ou d'un fragment de cet AcM, permet d'identifier directement un épitope donné de *T. equigenitalis* dans un échantillon ou une culture à analyser. En utilisant une protéine immunogène ou un  
20 anticorps anti-AcM ou un fragment de ce dernier, on mettra en évidence un contact préalable de l'échantillon ou de la culture avec la bactérie.

L'absence de réactions croisées des AcM de  
25 l'invention et de leurs fragments avec des épitopes de bactéries du genre *Taylorella* autres que *T.*



*equigenitalis*, et de bactéries d'un genre différent, est avantageusement mise à profit pour le diagnostic de pathologies liées à *T. equigenitalis*.

L'invention vise donc également l'utilisation  
5 desdits ACM et de leurs fragments pour le diagnostic d'une infection par *T. equigenitalis*, plus particulièrement de la métrite équine contagieuse, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un ou plusieurs ACM de  
10 l'invention, ou de leurs fragments, avec un prélèvement biologique, et

- la révélation de la réaction du type antigène-anticorps produite dans le cas de la présence de *T. equigenitalis* dans le prélèvement.

15 Les étapes de mise en contact et de révélation sont avantageusement mises en oeuvre comme indiqué pour la méthode précédente.

L'invention fournit également des kits pour la mise  
en oeuvre des méthodes d'identification et des méthodes  
20 de diagnostic décrites ci-dessus.

Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils renferment

- un ou plusieurs ACM ou leurs fragments ou au moins une protéine immunogène, ou un ou plusieurs anti-ACM ou  
25 leurs fragments,

- les réactifs, notamment les marqueurs ou tampons, permettant la révélation de la réaction immunologique visée, avec une notice d'utilisation.

Selon une autre disposition avantageuse de  
5 l'invention, les AcM et leurs fragments définis ci-dessus sont utilisables en thérapeutique pour lutter contre une infection par *T. equigenitalis*, et plus particulièrement contre la métrite équine contagieuse.

10 L'invention vise ainsi également des compositions pharmaceutiques renfermant un ou plusieurs AcM, ou leurs fragments, définis ci-dessus, comme vecteurs de médicaments ou comme agents d'immunothérapie passive, en association avec des véhicules  
15 pharmaceutiquement inertes. Elle vise également leur utilisation pour l'élaboration de biocapteurs.

Selon encore une autre disposition, l'invention vise l'utilisation des protéines immunogènes et des anti-AcM  
20 ou leurs fragments pour l'élaboration de compositions vaccinales préventives d'une infection par *T. equigenitalis*.

Les compositions vaccinales de l'invention sont  
25 caractérisées en ce qu'elles renferment au moins une protéine immunogène ou un anti-AcM ou leurs fragments,

tels que définis ci-dessus, en quantité suffisante pour susciter une réponse immunitaire, en association avec des excipients physiologiquement acceptables.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 3, qui représentent respectivement :

- la figure 1 représente une photo d'un test IIF (immunofluorescence indirecte) sur *T. equigenitalis* en présence d'AcM selon l'invention,

- la figure 2, une photo d'un immunoblot après réaction de protéines de *T. equigenitalis* avec des AcM de l'invention et du sérum de souris immunisée (sérum positif),

- la figure 3, une photo d'un dot blot réalisé sur les protéines non dénaturées d'une souche de *T. equigenitalis* de référence et mises à incuber avec les AcM selon l'invention, un sérum positif de souris ou un sérum négatif de souris (souris non immunisée).

Exemple 1 : Obtention et sélection d'hybridomes capables de produire des anticorps monoclonaux anti-*T. equigenitalis*

- 5 - souches de *T. equigenitalis* utilisées pour l'immunisation

On rapporte les résultats obtenus avec les neuf souches suivantes :

- 10 - deux souches de références (R1-16 et R2-19),  
provenant du Centre National d'Etudes Vétérinaires et  
Alimentaires - Laboratoire Central de Recherches  
Vétérinaires CNEVA-LCRV, Maisons-Alfort, France,  
- sept souches dites souches sauvages isolées  
15 dans quatre régions différentes du  
Nord-Ouest de la France (Indre et Loire,  
Calvados, Côtes d'Armor et Orne).

Ces souches sont identifiées dans le tableau I ci-après :

TABLEAU I

5	Désignation de la souche	Sources	Résistance à la streptomycine
	R1-16/16	CNEVA	S
10	R2-19/19	CNEVA	R
	1/ 129S	LVD37	R
	2/ 1	LVD14	R
	3/ 12.397	LDA22	R
	4/ 26.658	LDA22	R
15	5/ 7001-01	LDA22	R
	6/ 250	LVD61	R
	7/ 715	LVD61	R

S = sensible

20 R = résistante

Toutes ces souches sont cultivées sur des géloses d'agar chocolat avec ou sans addition d'actidione et de streptomycine. Elles sont incubées sous atmosphère humide  
 25 à 7 % de CO<sub>2</sub>.

Les analyses de réaction enzymatique et de fermentation de sucre sont effectuées à l'aide du système API-NH (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

5        En outre, ces souches sont testées pour leur activité catalase, cytochrome-oxydase et par le test d'agglutination du sérum (SAT), en utilisant un anti-sérum polyclonal de lapin.

La plupart d'entre elles présentent

- 10        - une forme cocobacillaire à Gram négatif,  
          - une activité catalase et cytochrome oxydase, et  
          - elles répondent positivement au test d'agglutination SAT.

15        On constate qu'elles présentent toutes

          - une activité phosphatase alcaline et gamma glutamyl transférase positives (excepté la souche de terrain 5 qui présente une activité gamma glutamyl transférase négative),

20        - des activités pénicillinase, ornithine-décarboxylase, uréase, lipase, bêtagalactosidase et proline-amyase négatives. On constate également qu'elles ne métabolisent pas les sucres (glucose, fructose, maltose, saccharose).

En outre, elles présentent des profils polypeptidiques et lipopolysaccharidiques très similaires.

5 Les deux souches de référence R1-16 et R2-19 présentent donc les propriétés généralement observées pour l'ensemble des souches de *T. equigenitalis* étudiées dans l'art antérieur et sont donc utilisées pour l'immunisation de souris.

10

- immunisation de souris

Les souches de référence R1-16 et R2-19 sont lavées deux fois dans du tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 et inactivées  
15 par chauffage à 56°C pendant 75 min. Les cellules sont alors diluées dans le PBS, jusqu'à l'obtention de suspensions bactériennes de densité optique 0,77 à 380 nm. Elles sont ensuite réparties en portions aliquotes et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

20

On injecte par voie intra-péritonéale, à des souris adultes BALB/C 0,5 ml de suspension bactérienne R1-16 et R2-19 émulsifiées avec l'adjuvant complet de Freund (2  
souris par souche). Une injection de rappel est effectuée  
25 au 14ème jour avec la même préparation. Au 21ème jour, les souris sont immunisées avec 0,2 ml de suspension sans

adjuvant par voie intra-veineuse et les cellules spléniques sont recueillies 2 jours plus tard.

- production d'hybridomes

5

Les hybridomes sont produits selon la procédure standard décrite par Kohler et Milstein (voir référence ci-dessus).

Des cellules de myélomes de souris SP2-0-Ag14 et des  
10 cellules spléniques immunes sont fusionnées dans un rapport 1/5 en utilisant du PEG 1500 (Sigma, l'Isle d'Abeau, France) et maintenues dans des plaques de cultures cellulaires à 96 puits contenant des macrophages de souris ou des cellules nourricières de rate ou un  
15 supplément OPI (Sigma) dans un milieu sélectif HAT-DMEM.

Une croissance d'hybridome est observée dans 820 des 1020 puits utilisés (81,37 %). On réalise les tests IIF sur 60 de ces 820 puits pour détecter les hybridomes producteurs des anticorps monoclonaux recherchés.

20

- criblage des hybridomes et des anticorps  
25 monoclonaux produits



Les hybridomes sont testés par immunofluorescence indirecte (IIF) pour la capacité de leurs surnageants à reconnaître les deux souches de référence de *T. equigenitalis*. On utilise la procédure standard décrite par Vaissaire et al. (1992), Bull. Acad. Vet. Fr. 65, 161-170.

Après deux lavages dans PBS 0,1 M, pH 7,4, les souches bactériennes sont remises en suspension dans le tampon PBS contenant, de plus, 1 % de formaldéhyde afin d'obtenir une suspension ayant une turbidité de 1 dans l'échelle de Mac Farland.

On applique 10 µl de cette suspension sur chaque spot de lamelles fluorescentes.

Après séchage 15 min à 37°C, les lamelles sont fixées dans de l'acétone pur pendant 15 min à température ambiante.

Après séchage, les lamelles sont mises à incuber avec 40 µl de surnageants d'hybridomes, pendant 30 min à 37°C.

Les lamelles sont ensuite lavées dans un bain de PBS sous agitation pendant 15 min. Après rinçage dans de l'eau distillée et séchage, les lamelles sont incubées 30 min à 37°C avec 40 µl d'une solution d'isothiocyanate de fluorescéine conjugué à la fraction F (ab) 2 de lapin

anti souris (Eurobio Les Ulis, France), dilué à 1/40 dans PBS contenant du bleu Evans (1/10000).

Les lamelles sont enfin lavées dans du PBS, rincées dans de l'eau distillée, séchées comme indiqué ci-dessus, 5 montées dans du PBS renfermant 1 % de glycérine et examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

On utilise un sérum de souris non immunisée comme témoin négatif. Le conjugué d'anti-sérum de souris FITC est incubé avec chaque souche bactérienne pour servir de 10 témoin de conjugué.

Les clones positifs au test IIF sont transférés pour expansion avant clonage dans des plaques à 24 puits contenant le milieu HAT-DMEM.

On rapporte sur la figure 1 un test IIF sur *T. equigenitalis* en présence d'AcM selon l'invention. Cette 15 figure montre une forte fluorescence de la paroi bactérienne.

4 à 7 jours plus tard, les hybridomes de ces puits sont clonés par la méthode de dilution limite afin 20 d'obtenir une cellule unique par puits dans une plaque de culture tissulaire à 96 puits en utilisant le milieu HT-DMEM et des cellules nourricières. Les puits contenant un seul clone sont criblés par IIF et les cellules positives sont congelées dans de l'azote liquide.

Parmi l'ensemble des clones positifs 14 d'entre eux sont utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux et la caractérisation de ces anticorps.

Les surnageants de cultures tissulaires d'hybridomes  
5 sont tamponnés par addition de Tris 1M, pH 8,0 (vol. 1/20) et de l'azide de sodium (0,02 %). Des préparations aliquotes sont effectuées et stockées à -20°C.

Exemple 2 : Caractérisation des anticorps  
10 monoclonaux anti-*T. equigenitalis*

- spécificité des anticorps monoclonaux

Afin de vérifier la spécificité des anticorps  
15 monoclonaux, les surnageants des 14 clones d'hybridomes obtenus selon l'exemple 1 sont testés par IIF selon la capacité de leurs surnageants à reconnaître d'autres souches bactériennes que les deux souches de référence R-16 et R-19 utilisées pour l'immunisation, à savoir :

20 - les 7 souches sauvages de *T. equigenitalis* décrites dans l'exemple 1, et

- des souches bactériennes décrites dans l'art antérieur comme donnant lieu à des réactions croisées avec les anti-sérums de *T. equigenitalis* ou couramment  
25 présentes dans la flore génitale : *Actinobacillus equuli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*,

*Pasteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*,  
*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* et  
*Klebsiella pneumoniae*. Ces bactéries sont cultivées sur  
un milieu sang-agar base Columbia.

- 5 Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau  
II ci-après.



Les 14 anticorps monoclonaux testés reconnaissent les sept souches sauvages de *T. equigenitalis*. 3 d'entre eux donnent une réponse plus faiblement positive, à savoir 7B7.1 ; 7B7.10 et 10C9.6.

Aucun des 14 anticorps monoclonaux testés ne reconnaît une des 8 souches bactériennes qui n'appartiennent pas à l'espèce *T. equigenitalis*.

Ces résultats démontrent la spécificité des 14 anticorps monoclonaux testés envers les souches de *T. equigenitalis* et l'absence de réactivité croisée entre *T. equigenitalis* et d'autres bactéries, n'appartenant pas à l'espèce *T. equigenitalis*, et, soit ayant été décrites avec les outils de l'art antérieur comme présentant une réactivité croisée avec cette espèce (*Actinobacillus equuli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*) soit faisant partie de la flore génitale courante (*Streptococcus equi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Les réactions positives de l'antisérum polyclonal de lapin observées en IIF avec *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas fluorescens* n'ont donc pas été observées avec les anticorps monoclonaux de l'invention.

Les anticorps monoclonaux objet de la présente demande ne détectent pas de différence antigénique entre les différentes souches de *T. equigenitalis* testées.

5 - SAT (Serum Agglutination Test)

Pour tester la réactivité des anticorps monoclonaux au SAT, seule la souche R-19 a été utilisée.

Les résultats obtenus sont donnés dans la colonne 4  
10 du tableau III ci-après.

13 des 14 anticorps monoclonaux donnent une réponse positive.

TABLEAU III

N°	Désignation de l'AcM	HF	SAT	Immunoblot	Dot blot avec dénaturation	Dot blot sans dénaturation	Spécificité monoclonale (kDa)	Isotype
1	3B6.1	+	+	+	+	+	150	IgM
2	3B6.4	+	+	-	-	+		IgM
3	3B6.11	+	+	-	-	+		IgM
4	7B7.1	+	-	-	-	+		IgG1
5	7B7.10	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgG1
6	7B8.1	+	+	+	+	+	52.7	IgG3
7	7C4.10	+	+	+	+	+	52.7	IgG3
8	7D7.3	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgM
9	7D7.16	+	+	-	-	+		IgM
10	10C4.17	+	+	-	-	+		IgG3
11	10C9.6	+	+	-	-	+		IgG2b
12	11C9.1	+	+	+	+	+	120	IgG2b
13	11C9.4	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgG2b
14	11C9.5	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgG2b



- localisation d'épitopes spécifiques

préparation des extraits protéiques et

5 lipopolysaccharidiques de la souche R-19 de *T. equigenitalis*

- Extrait en conditions non dénaturantes (EN) de *T. equigenitalis*

10 Les cellules de *T. equigenitalis* ont été récoltées par centrifugation (6000 g, 10 min) et lavées trois fois dans une solution de PBS 0,1 M à pH 7,4. Les culots ont été remis en suspension dans un petit volume de tampon SDS (sodiumdodécylsulfate à 2 %, PBS pH = 7,4) et mis à  
15 incuber à 37°C pendant 30 min. A la suite de ce procédé, les protéines conservent leur activité biologique. Après extraction dans le tampon SDS, l'intégrité des cellules a été contrôlée par observations en microscopie à contraste de phases. Après centrifugation (10000 g, 10 min), les  
20 surnageants contenant EN ont été complètement dialysés contre de l'eau distillée à 4°C pendant 48 h, répartis en aliquotes et conservés à l'état congelé (-80°C) jusqu'à utilisation. La concentration en protéines de EN a été  
25 déterminée à l'aide du test protéique BioRad (BioRad, Ivry-sur-Seine, France).

- Extrait en conditions dénaturantes ED

Les extraits EN des souches de *T. equigenitalis* ont été dissouts dans un solvant échantillon (Tris.HCl 0,1 M  
5 pH 6,8 ; glycérol 10 % ; SDS 2 % ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM et bleu de bromophénol 0,01 %) afin d'obtenir une concentration en protéines de 1 mg/ml, puis ont été portés à ébullition à 100°C pendant 5 min (extrait en conditions dénaturantes de *T. equigenitalis*, ED).

10

- Extrait lipopolysaccharidique (LPS)

Des extraits EN digérés par la protéinase K ont été utilisés comme extraits LPS (Hanner et al., 1991 Am. J. Vet. Res. 52,1065-1068). 10  $\mu$ l de EN ont été dilués dans  
15 35  $\mu$ l du tampon de digestion pour LPS. Ce tampon de digestion pour LPS est constitué de 0,0625 M Tris.HCl pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 10 % glycérol et de 5  $\mu$ g de protéinase-K (Sigma). Ces préparations ont été incubées à 57°C pendant 1 heure et chauffées à 100°C pendant 5 min avant  
20 électrophorèse.

- électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
dodecylsulfate de sodium (SDS - PAGE)

- 5        Pour la séparation des protéines bactériennes, une  
électrophorèse discontinue SDS-PAGE a été utilisée  
(Laemmli, 1970, Nature, 227, 680-685). Le gel de  
séparation contenait 12 % d'acrylamide et le gel de  
stacking 4 % d'acrylamide. 20 µl de chaque échantillon ED  
10 ont été déposés au fond des puits à une concentration  
équivalente à 5 µg de protéines par piste.  
L'électrophorèse a été réalisée à 100 V, 50 mA (courant  
continu) pendant 10 h dans une unité verticale de plaques  
pour gel (Hoefer Scientific Instr., San Francisco, CA).
- 15    Pour les déterminations de poids moléculaire, un kit  
destiné à la calibration des faibles poids moléculaires  
(Pharmacia-Biotech, Saint-Quentin en Yvelines, France) a  
été utilisé. Pour visualiser les bandes sur la matrice de  
polyacrylamide, on a utilisé la coloration au Coomassie  
20 R350 (Pharmacia-Biotech, France) et pour la visualisation  
des composants LPS, la coloration argentique (Tsai et  
Frasch, 1982 Anal. Biochem. 199, 115-119).

- immunoblotting

Les bandes de protéines ont été transférées du gel sur une membrane Immobilon<sup>R</sup> PVDF (Millipore Corp., St Quentin en Yvelines, France) par électroblotting à l'aide d'une cellule de transfert électrophorétique MiniTrans-Blot<sup>R</sup> (BioRad) avec une solution tampon de transfert (Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; méthanol 20 % v/v ; pH = 8,3) à 100 V, 250 mA pendant 1 heure. Pour vérifier les conditions de transfert électrophorétique et pour identifier les bandes protéiques sur les membranes, on a utilisé la coloration des protéines totales par l'or colloïdal (BioRad, Colloidal Gold Total Protein Stain). Après transfert, les membranes ont été immergées pendant 30 min dans une solution bloquante (gélatine 3 % dans Tris 20 mM et NaCl 0,5 M) et rincées sous douce agitation dans une solution de lavage (Tris 20 mM ; NaCl, 0,5 M ; Tween<sup>R</sup> 20 0,05 %).

Les membranes ont alors été mises en contact avec des solutions d'anticorps monoclonaux diluées de 1/100 à 1/1000 dans le tampon pour anticorps (Tris 20 mM ; NaCl 0,5 M, Tween<sup>R</sup> 20 0,05 % gélatine 1 %) pendant 180 min à 25°C.

La fixation des anticorps monoclonaux aux bandes peptidiques a été visualisée à l'aide de phosphatases alcalines (PA) conjuguées à des immunoglobulines IgG de

chèvre (chaînes lourdes et légères) anti-souris (BioRad, dilution à 1/2000) et à l'aide d'une solution substrat pour PA (BioRad).

Un sérum positif provenant de souris immunisées avec  
5 une souche de référence de *T. equigenitalis* et un sérum négatif issu de souris non immunisées ont été utilisés comme témoins expérimentaux. La figure 2 illustre un immunoblot entre les protéines bactériennes et les ACM selon l'invention d'une part et le sérum positif de  
10 souris d'autre part.

Le sérum positif collecté de souris immunisées réagit avec 5 protéines de la souche R-19 : 120 kDa ; 52,7 kDa ; 33, 4 kDa ; 17,5 kDa et 22 (LPS) kDa.

15 8 des 14 anticorps monoclonaux testés réagissent positivement et 6 d'entre eux négativement. Les épitopes spécifiques reconnus par ces 8 anticorps monoclonaux réagissant positivement sont :

150 kDa (LPS) pour l'anticorps monoclonal 3B6.1,  
20 120 kDa (LPS) pour l'anticorps monoclonal 11C9.1,  
52,7 kDa (LPS) pour les anticorps monoclonaux 7B8.1 et 7C4.10,  
22 kDa (LPS) pour les anticorps monoclonaux 7B7.10, 7D7.3, 11C9.4 et 11C9.5

25 Ces résultats sont également rassemblés dans le tableau III, colonnes 5 et 8.

- dot-blotting

Des membranes Immobilon<sup>R</sup> PVDF (Sigma) ont été pré-  
5 humidifiées avec une solution de méthanol à 100 % pendant  
1 à 3s, immergées dans de l'eau distillée pendant 1-2 min  
afin d'éluer le méthanol et équilibrées dans une solution  
de lavage (Tris 20 mM ; NaCl 500 mM ; Tween<sup>R</sup> 20 0,05 % ;  
pH = 7,5). Les extraits EN et ED ont été fixés aux  
10 membranes par incubation pendant 1 heure à température  
ambiante. Les membranes dot ont été lavées deux fois  
pendant 10 min dans la solution de lavage puis immergées  
dans la solution bloquante (gélatine 3 % dans Tris 20 mM  
et NaCl 500 mM) pendant 1 heure. Les membranes ont été  
15 lavées deux fois comme précédemment et incubées avec les  
anticorps monoclonaux sélectionnés dans les mêmes  
conditions que pour l'immunoblotting.

La fixation des anticorps monoclonaux aux membranes  
de dot blot a été révélée à l'aide de PA conjuguées à des  
20 immunoglobines IgG de chèvre (chaînes lourdes et légères)  
anti-souris et à l'aide d'une solution substrat pour PA  
(BioRad).

Les mêmes sérums, témoins positifs et négatifs, ont  
été utilisés tout comme pour l'immunoblotting.

Pour déterminer si les résultats négatifs observés sur l'immunoblotting sont dus au fait que les épitopes ont été endommagés par les réactifs dénaturants utilisés pour préparer les extraits, les 14 anticorps monoclonaux sont confrontés en dot-blot aux extraits EN et ED de la souche R-19.

Sur la figure 3, on rapporte en dot blot les protéines de R19 ayant réagi sur les pistes 1 à 14 avec les AcM du tableau III; sur la piste SP avec le sérum positif de souris et sur la piste SN avec le sérum négatif de souris. Les résultats obtenus sont également rassemblés dans le tableau III, colonnes 6 et 7.

Les 6 anticorps qui présentent un immunoblot négatif présentent également un dot-blot négatif avec les extraits dénaturés de la souche R-19 (Tableau III, colonnes 5 et 6). Ils présentent cependant un dot-blot positif avec les extraits non dénaturés (Tableau III, colonne 7).

En conditions non dénaturantes (traitement au SDS seulement), la conformation et l'activité des protéines restent intactes mais, sous des conditions réductrices (traitement au  $\beta$ -mercaptoéthanol et hautes températures), la conformation de certaines protéines change et les

épitopes sont détruits. L'absence de réactivité des 6 anticorps monoclonaux testés en immunoblot avec la souche R-19 est donc très vraisemblablement due à de tels changements de conformation et destruction d'épitopes.

5

8 anticorps monoclonaux qui conservent leur réactivité sur les extraits bactériens ED ont donc été produits.

Ces 8 anticorps monoclonaux peuvent donc constituer  
10 des réactifs appropriés à la détection des antigènes de *T. equigenitalis* et, plus particulièrement, au diagnostic de la MCE. De tels anticorps peuvent servir à caractériser des bactéries du genre *Taylorella* dans toute  
préparation biologique utilisant des conditions  
15 dénaturantes.

#### - Détermination de l'isotype

Pour la détermination de l'isotype des anticorps  
20 monoclonaux, on a utilisé le kit immunotype de chez Sigma qui est constitué de bandelettes de nitrocellulose pré-recouvertes d'anticorps anti-isotype d'immunoglobulines de souris. Après incubations supplémentaires, l'identité de l'isotype des immunoglobulines est révélée à l'aide  
25 d'un système de détection biotine-avidine-enzyme.



Les résultats obtenus figurent dans la colonne 9 du tableau III.

Les 14 anticorps monoclonaux produits font partie  
 5 des IgM pour 5 d'entre eux, des IgG2b pour 4 d'entre eux,  
 des IgG3 pour 3 d'entre eux et des IgG1 pour 2 d'entre  
 eux.

Exemple 3 :

10

Essai comparatif des différents tests de diagnostic de la  
 MCE

- a) culture biologique de la flore bactérienne
- 15 b) détection par polyclonaux et IIF
- c) détection par l'invention objet de la présente  
 demande : monoclonaux et IIF.

Pendant 1 mois, 368 écouvillons de juments (fosse  
 clitoridienne, de col utérin) et d'étalons (liquide  
 20 liquide pré-éjaculatoire, fosse uréthrale) ont été étudiés  
 par les deux techniques d'immunofluorescences, la  
 technique au sens de la note de service du Ministère de  
 l'agriculture et de la pêche (DGAL/SDSPA/N95/N°8037) avec  
 anticorps polyclonaux et la technique selon l'invention.  
 25 Les positifs par l'une des deux techniques ont subi un  
 isolement par culture sur milieux gélosés. 64

prélèvements ont été trouvés positifs avec les anticorps polyclonaux et 17 avec les anticorps monoclonaux ; aucune mise en culture n'a permis d'isoler de bactérie *T.equigenitalis*.

- 5 Ces résultats mettent bien en évidence la plus forte spécificité apportée par l'invention dans cette étude.

**Exemple 4 : Production d'anti-anticorps anti-Taylorella equigenitalis**

10

1. Production des anticorps monoclonaux anti-T. equigenitalis (AcM1)

On opère comme indiqué ci-dessus.

2. Purification des AcM1

- 15 Les AcM1 sont précipités par addition de sulfate d'ammonium saturé à la concentration finale de 50%. Après centrifugation, le précipité est remis en suspension dans du PBS, puis filtré sur gel de Séphadex® G75 (Pharmacia) et enfin purifié par chromatographie d'affinité sur une
- 20 colonne de protéine A- Sépharose® CL-4B.

3. Préparation de l'immunogène

- Les AcM1 purifiés sont homopolymérisés en présence de glutaraldéhyde à 0,25% pendant heures à 4°C. La réaction est stoppée par adjonction d'un tampon glycine 0,2M et
- 25 les polymères sont dialysés contre du PBS.

#### 4. Immunisation de souris

Des souris BALB/C sont immunisées par 1 injection SC d'un mélange à partie égale de 50µg d'AcM1 polymérisés et d'adjuvant de Freund complet. 2 injections ultérieures  
5 sont pratiquées à 2 semaines d'intervalle, l'une avec de l'adjuvant de Freund incomplet, et l'autre sans aucun adjuvant et par voie péritonéale.

5. Obtention des anticorps monoclonaux anti-anticorps contre T.equigenitalis.(AcM2)

10 On procède comme décrit plus haut.

#### 6. Purification des fragments Fab des AcM1

Des fragments Fab des anticorps AcM1 sont purifiés après digestion ds AcM1 par de la papaïne (incubation 45 min à 37°C des AcM1 dans une solution de papaïne, de 2-β-  
15 mercaptoéthanol, d'EDTA 1,5M à pH8. le rapport est de 10µg de papaïne par mg d'AcM1. La digestion est stoppée par l'addition de N-méthylmaléimide 10mM (Sigma). Les anticorps non digérés et les fragments Fc sont éliminés par chromatographie d'affinité sur une colonne de  
20 protéine A-Sépharose CL-4B® (Pharmacia). La pureté de sfragments Fab est vérifiée par SDS-PAGE.

#### 7. Criblage des hybridomes producteurs d'AcM2 par un test ELISA

Les microplaques (Maxisorb, Nunc) sont incubées 16h à  
25 4°C avec 100µl/puit d'une suspension de 0,2µg /ML de Fab

dans du tampon carbonate pH8. Les microplaques sont lavées 3 fois avec du PBS-Tween 20® (0,05%), pH 7,2, puis les sites non spécifiques sont bloqués par une solution de BSA 2% dans le PBS-Tween 20® pendant 30 min  
5 à 37°C. Après 3 lavages par du PBS-Tween 20®, les surnageants de culture des hybridomes sont incubés 1h à 37°C. Après 3 lavages par du PBS-Tween 20®, la réaction est révélée par un conjugué anti-souris marqué à la peroxydase et son substrat.

10 Les hybridomes positifs par le test ELISA sont sélectionnés et les surnageants sont utilisés pour la préparation du vaccin.

#### 8. Préparation du vaccin

Les anticorps AcM2 des hybridomes sélectionnés, puis  
15 leurs fragments Fab correspondants sont purifiés selon les méthodes décrites ci-dessus.

Les fragments Fab sont couplés à la keyhole limpet hemocyanin (KLH, Sigma) par incubation pendant 16h à 4°C dans une solution 0,05% de glutaraldéhyde (Sigma), dans  
20 un rapport de 1/1. La réaction est stoppée par une solution de glycine 0,02M et les conjugués sont dialysés contre du PBS.

La protéine est dosée à 25-100µg par dose de vaccin et le vaccin est additionné d'hydroxyde d'alumine à titre  
25 d'adjuvant.

## REVENDICATIONS

5

1/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, plus particulièrement, leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent un épitope d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*.

10

2/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, plus particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils ne présentent pas de réaction croisée avec un ou des épitope(s) d'une bactérie d'une espèce *Taylorella* différente ou d'une bactérie d'un genre différent.

20

3/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître des protéines de *T. equigenitalis* du groupe comprenant des protéines telles que les protéines de 150 kDa, 120 kDa, 52,7 kDa ou 22 (LPS) kDa.

25

4/ Anticorps monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils peuvent être obtenus à partir d'hybrides

- par fusion de cellules de myélome murin non  
secrétrices avec des cellules spléniques issues de souris  
immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T.*  
*equigenitalis* inactivée ou d'extrait(s) d'une telle  
5 souche, et

- clonage et sélection selon la propriété de  
leur surnageant de culture à reconnaître un ou des  
épitope(s) d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*,

- récupération des anticorps monoclonaux  
10 recherchés, suivie le cas échéant d'une purification.

5/ Protéines immunogènes, caractérisées en ce  
qu'elles sont capables d'interagir avec des anticorps  
monoclonaux ou leurs fragments selon l'une quelconque des  
15 revendications 1 à 4.

6/ Anticorps monoclonaux, et leurs fragments,  
particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>,  
caractérisés en ce qu'il s'agit d'anti-anticorps, à  
20 savoir d'anticorps capables d'interagir avec les  
anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 4.

7/ Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux  
25 kDa selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,  
caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non  
sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris  
immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T.*  
5 *equigenitalis* ou d'extrait(s) d'une telle souche,

- le criblage à l'aide d'une technique de  
révélation, telle que notamment l'immunofluorescence  
indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture  
10 présentent une réaction positive avec une bactérie de  
l'espèce *T. equigenitalis* ou un fragment de celle-ci,

- la sélection par clonage de tels hybridomes  
au regard de leur réactivité, par rapport à *T.*  
*equigenitalis*, et

15

- la récupération des anticorps monoclonaux,  
suivie le cas échéant de leur purification.

8/ Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux  
20 selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il  
comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non  
sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris  
25 immunisées à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de leurs

fragments tels que défini(s) dans l'une des revendications 1 à 4,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que notamment l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture  
5 présentent une réaction positive avec l'un desdits anticorps monoclonaux ou leurs fragments,

- la sélection par clonage de tels hybridomes,  
10 et  
- la récupération des anti-anticorps recherchés.

9/ Souches d'hybridomes caractérisées en ce  
15 qu'elles sont capables de sécréter des anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

10/ Souches d'hybridomes caractérisées en ce  
20 qu'elles sont capables de sécréter des anticorps monoclonaux selon la revendication 6.

11/ Méthode d'identification d'une bactérie de l'espèce *T equigenitalis* dans un échantillon ou dans une  
25 culture, comprenant :



- la mise en contact de l'échantillon ou de la culture à analyser, susceptible de renfermer *T equigenitalis*, avec une quantité efficace d'au moins un anticorps monoclonal ou un fragment d'un tel anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou, en variante, pour mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre *T equigenitalis* avec une protéine immunogène selon la revendication 5 ou un anticorps selon la revendication 6, dans des conditions permettant une réaction du type antigène-anticorps et

- la révélation du produit de réaction de type antigène-anticorps éventuellement formé.

12/ Méthode de diagnostic d'une infection par *T equigenitalis*, plus particulièrement de la métrite contagieuse équine dans un échantillon ou une culture, comprenant :

- la mise en contact d'un ou plusieurs anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou de leurs fragments, avec un prélèvement biologique, et

- la révélation de la réaction du type antigène-anticorps produite dans le cas de la présence de *T equigenitalis* dans le prélèvement.

13/ Kits pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisés en ce qu'ils comportent

5

- un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou au moins une protéine immunogène selon la revendication 5, ou un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon la revendication 10 6, et

- les réactifs, notamment les marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction 15 immunologique visée, ainsi qu'une notice d'utilisation.

16/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque 20 des revendications 1 à 4, comme vecteurs de médicaments ou comme agents d'immunothérapie passive, seuls ou en association avec des véhicules pharmaceutiquement inertes.

25 17/ Compositions vaccinales, caractérisées en ce qu'elles renferment, en association avec des

excipients physiologiquement acceptables, au moins une protéine immunogène telle que définie selon la revendication 6, ou un anticorps selon la revendication 6, ou un fragment d'un tel anticorps, en quantité  
5 suffisante pour susciter une réaction immunitaire..

18/ Utilisation des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 4 pour l'élaboration de biocapteurs.

#### 4. Immunisation de souris

Des souris BALB/C sont immunisées par 1 injection SC d'un mélange à partie égale de 50µg d'AcM1 polymérisés et d'adjuvant de Freund complet. 2 injections ultérieures  
5 sont pratiquées à 2 semaines d'intervalle , l'une avec de l'adjuvant de Freund incomplet, et l'autre sans aucun adjuvant et par voie péritonéale.

5. Obtention des anticorps monoclonaux anti-anticorps contre *T.equigenitalis*.(AcM2)

10 On procède comme décrit plus haut.

#### 6. Purification des fragments Fab des AcM1

Des fragments Fab des anticorps AcM1 sont purifiés après digestion des AcM1 par de la papaïne (incubation 45 min à 37°C des AcM1 dans une solution de papaïne, de 2-β-  
15 mercaptoéthanol, d'EDTA 1,5M à pH8. le rapport est de 10µg de papaïne par mg d'AcM1. La digestion est stoppée par l'addition de N-méthylmaléimide 10mM (Sigma). Les anticorps non digérés et les fragments Fc sont éliminés par chromatographie d'affinité sur une colonne de  
20 protéine A-Sépharose CL-4B® (Pharmacia). La pureté des fragments Fab est vérifiée par SDS-PAGE.

#### 7. Criblage des hybridomes producteurs d'AcM2 par un test ELISA

Les microplaques (Maxisorb, Nunc) sont incubées 16h à  
25 4°C avec 100 µl/puit d'une suspension de 0,2 µg/ml de Fab

13/ Kits pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisés en ce qu'ils comportent

5

- un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou au moins une protéine immunogène selon la revendication 5, ou un ou plusieurs anticorps  
10 monoclonaux, ou leurs fragments, selon la revendication 6, et

- les réactifs, notamment les marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction  
15 immunologique visée, ainsi qu'une notice d'utilisation.

14/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque  
20 des revendications 1 à 4, comme vecteurs de médicaments ou comme agents d'immunothérapie passive, seuls ou en association avec des véhicules pharmaceutiquement inertes.

25 15/ Compositions vaccinales, caractérisées en ce qu'elles renferment, en association avec des

excipients physiologiquement acceptables, au moins une protéine immunogène telle que définie selon la revendication 6, ou un anticorps selon la revendication 6, ou un fragment d'un tel anticorps, en quantité  
5 suffisante pour susciter une réaction immunitaire.

16/ Utilisation des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 4 pour l'élaboration de biocapteurs.

PL.1/2

FIGURE 1

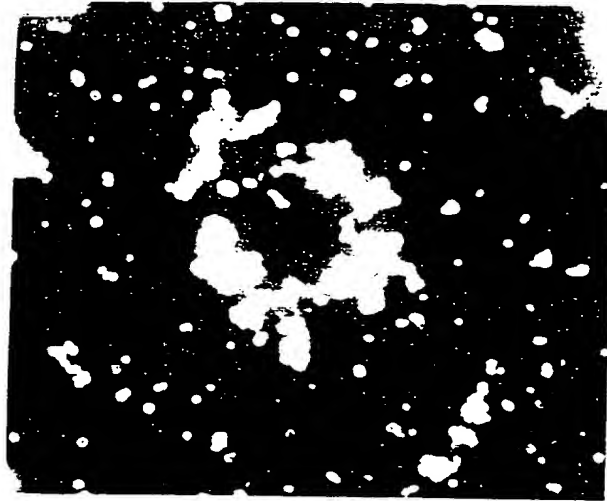


FIGURE 3

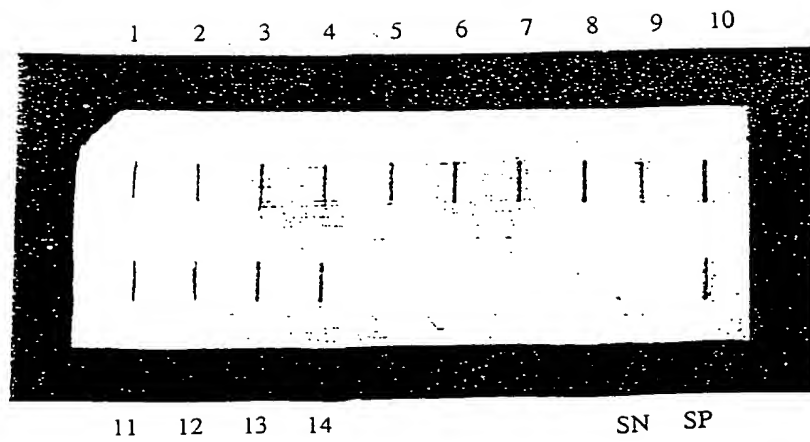


FIGURE 3

